



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①⑫ **Offenlegungsschrift**
①⑩ **DE 44 01 839 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
C 12 Q 1/06
C 12 Q 1/18
G 01 N 27/403
// (C12Q 1/10, C12R
1:19)

②
DE 44 01 839 A 1

②① Aktenzeichen: P 44 01 839.8
②② Anmeldetag: 22. 1. 94
②④ Offenlegungstag: 27. 7. 95

⑦① Anmelder:

Dechema Deutsche Gesellschaft für Chemisches
Apparatewesen, Chemische Technik und
Biotechnologie e.V., 60486 Frankfurt, DE

⑦② Erfinder:

Sell, Dieter, 63452 Hanau, DE; Langer, Otto-Ulrich,
61462 Königstein, DE

⑤④ Meßsystem zur Bestimmung der Anzahl und des physiologischen Aktivitätszustandes von Zellen oder Organismen, insbesondere Mikroorganismen

⑤⑦ Die Erfindung bezieht sich auf ein Meßsystem zur Bestimmung der Anzahl und des physiologischen Aktivitätszustandes von Zellen oder Organismen, insbesondere Mikroorganismen.

Die Redoxreaktionen des Energiestoffwechsels von Zellen oder Organismen werden zur Erzeugung eines elektrischen Meßsignals zugänglich gemacht. Das elektrische Meßsignal kann mit Hilfe elektrochemischer Methoden, vorzugsweise einer bioelektrochemischen Brennstoffzelle, erzeugt werden. Das vorgestellte Meßsystem kann bei der Kontrolle und Steuerung biotechnischer Fermentationen oder zur Detektion stoffwechselfördernder oder stoffwechselgefährdender Substanzen eingesetzt werden.

DE 44 01 839 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 05. 95 508 030/185

5/31

Die Erfindung betrifft ein Meßsystem zur Bestimmung der Anzahl und des physiologischen Aktivitätszustandes von Zellen oder Organismen, insbesondere Mikroorganismen, und bezieht sich auf das Problem, deren aktuelle Stoffwechselaktivität als aussagefähiges Meßsignal darstellen zu können.

Zur Bestimmung der Anzahl von Zellen oder Organismen, insbesondere Mikroorganismen sind besonders zur Überwachung technischer Fermentationssysteme eine Reihe verschiedener Verfahren bekannt.

Hierzu gehören optische, elektronische, elektrochemische, kalorimetrische oder auch elektroakustische Methoden. Zu den optischen Methoden gehören solche auf der Basis von Trübungsmessungen (Turbidimetrie) oder Messungen der Lichtstreuung (Nephelometrie), wobei die gemessenen Effekte von der Anzahl der Zellen oder Organismen in Suspensionen abhängen und zur Quantifizierung derselben herangezogen werden können (Römpf Lexikon, Band Biotechnologie, S. 541 und 786—787, Thieme Verlag 1992). Probleme mit turbidimetrischen und nephelometrischen Methoden gibt es dann, wenn in der Suspension Fremdpartikel enthalten sind (was bei technischen Fermentationsmedien beispielsweise häufig der Fall ist), wenn die zu bestimmenden Zellen oder Organismen aggregierte Wuchsformen bilden (z. B. Mycelien) oder auf einen Träger aufwachsen, so daß Einzelzellen nicht erfaßt werden können, oder wenn bei Begasung der Suspension Störsignale durch Gasblasen auftreten.

Eine weitere optische Methode ist die Messung der Fluoreszenz bestimmter Zellinhaltsstoffe nach vorheriger Anregung durch UV-Licht. Die meisten beschriebenen Entwicklungen dieser Art befassen sich mit der Fluoreszenz der reduzierten Form des Nicotin-Adenin-Dinucleotids (NADH), eines Co-faktors für Oxidoreduktasen, der in nahezu allen Zellen und Organismen zu finden ist (Scheper et al., Chemical Engineering Journal 34, B7—B12, 1987).

Eine Zellzahlbestimmung, die aus einer solchen Fluoreszenzmessung abgeleitet wird, weist jedoch eine recht große Schwankungsbreite auf, da die NADH-Konzentration innerhalb einer Zelle oder eines Organismus durchaus nicht konstant ist, sondern sich in Abhängigkeit von äußeren Faktoren verändert, weshalb dieses Verfahren auch zur Schadstoffdetektion vorgeschlagen wurde. Hinzu kommt, daß die Fluoreszenzdetektion bei geringen Zell- bzw. Organismendichten schwierig ist und zudem einer Reihe von Störeinflüssen wie Lichtabsorption durch nichtfluoreszierende Materialien oder der Fluoreszenz mehrerer Substanzen im gleichen Wellenlängenbereich ausgesetzt ist.

Die wohl älteste optische Methode zur Bestimmung der Zell- oder Organismenzahl ist das direkte Abzählen mit Hilfe eines Mikroskopes (Römpf Lexikon, Band Biotechnologie, S. 834, Thieme Verlag 1992). Automatische Bildverarbeitungssysteme tragen in neuerer Zeit dazu bei, daß das Zählen von Zellen oder Organismen schneller und komfortabler geschehen kann. Nachteile sind jedoch der nach wie vor recht hohe Zeitaufwand bei der Probenvorbereitung sowie die hohen Fehlerrisiken für das Ergebnis, die der aufwendigen Probenvorbereitung innewohnen.

Im Bereich der elektronischen Meßmethoden sind Zellzahlbestimmungen auf der Basis von Impedanzmessungen vorgestellt worden (Harris et al., Bioelectrochem. Bioeng. 11, 15—28, 1983). Die Meßanordnung be-

steht aus flächigen Elektroden, zwischen die eine Probe mit einer unbekannten Anzahl an Zellen oder Organismen gebracht wird. In Abhängigkeit von der Anzahl der in der Probe enthaltenen Partikel verändern sich elektrische Kenngrößen der Meßzelle; diese Veränderungen können zur Partikelzahlbestimmung herangezogen werden. Ein Problem ergibt sich, wenn sich durch "fouling"-Effekte Deckschichten auf den Elektrodenoberflächen bilden, die die Meßergebnisse verfälschen. Weiterhin besteht eine Limitierung der Anwendbarkeit dieser Meßmethode bei der Leitfähigkeit der einzusetzenden Proben, die unterhalb eines Wertes von $10\ \mu\text{S}$ liegen sollte; dieser Wert wird beispielsweise von nahezu allen Fermentationsmedien überschritten.

Eine weitere elektronische Meßmethode zur Zellzahlbestimmung nutzt den Umstand aus, daß Zellen oder Organismen sich bezüglich ihrer Leitfähigkeit in der Regel von dem wäßrigen Milieu unterscheiden, welches sie umgibt; auf diese Weise können sie über die Veränderung der Leitfähigkeit bei der Passage einer Meßstrecke erfaßt und gezählt werden (Coulter Counter) (Pons (ed.), Bioprocess Variables, 86—106, Carl Hanser Verlag, München, Wien, New York, Barcelona 1992). Auch hierbei können Zellen und Organismen nicht von sonstigen Partikeln, und Zellverbände können auch nicht von Einzelzellen unterschieden werden.

Der Verbrauch an gelöstem Sauerstoff stellt ein durchaus aussagefähiges Indiz für die Bestimmung der Stoffwechselaktivität und der Anzahl an Zellen oder Organismen dar. Auf dieser Basis wurden Systeme zur Zellzahlbestimmung, aber auch zur Detektion von stoffwechselschädigenden oder stoffwechselschädigenden Substanzen entwickelt und vorgeschlagen (Matsanuga et al., Applied Microbiology and Biotechnology 12, 97—101, 1981), für Meßzwecke problematisch erweist sich jedoch die Tatsache, daß Sauerstoff nicht allein Oxidationsmittel für den Energiestoffwechsel, sondern auch Bausubstrat für den Aufbau von Biomasse ist. Aus diesem Grund erfolgt die Sauerstoffaufnahme durch Organismen in Abhängigkeit von der jeweiligen Kultivationsphase nicht gleichmäßig. Darüber hinaus kann mittels der Sauerstoffverbrauchsmessung eine Bestimmung der Zellzahl und des Aktivitätszustandes der Zellen oder Organismen in anaeroben Systemen nicht erfolgen.

Stoffwechselaktivitäten von Zellen oder Mikroorganismen sind stets mit der Freisetzung von Wärme verbunden. Durch die exakte Bestimmung dieser Wärmeentwicklung sind Rückschlüsse auf die aktuelle Anzahl vorhandener Zellen oder Organismen möglich. Hierzu werden Kalorimeter eingesetzt (Luong und Volesky, Canadian Journal of Chemical Engineering 58 497—504, 1980), die einen recht hohen apparativen Aufwand erfordern und gegen Störeinflüsse (z. B. Energieeintrag durch Rührer und Begasung) recht anfällig sind.

Das Grundprinzip elektroakustischer Messungen beruht darauf, daß die Resonanzfrequenz einer Proben- und einer Referenzküvette mit steigender Partikelzahl in der Probenküvette zunehmend verschoben wird (Kilburn et al., Biotechnology and Bioengineering 33, 1379—1384, 1989). Diese Verschiebung kann zur Bestimmung der Partikelzahl in der Probe herangezogen werden. Unbefriedigende Ergebnisse liefert dieses System dann, wenn neben Zellen oder Organismen andere Partikel vorhanden sind oder wenn Gasblasen in die Probenküvette gelangen.

Das Verfahren gemäß der Erfindung beruht im Gegensatz zu den bisher bekannten Meßmethoden darauf, die Redoxreaktionen des Energiestoffwechsels von Zel-

len und Organismen, insbesondere Mikroorganismen, direkt für die Erzeugung eines elektrischen Meßsignals zugänglich zu machen, wodurch einerseits eine Bestimmung der aktuellen Anzahl von Zellen oder Organismen, andererseits eine Beurteilung des momentanen physiologischen Aktivitätszustandes dieser Mikroorganismen ermöglicht wird.

Die Erzeugung des elektrischen Meßsignals erfolgt dabei mittels elektrochemischer Methoden, vorzugsweise durch eine bioelektrochemische Brennstoffzelle, die aus einem Gehäuse, einer Anode, einer Kathode sowie deren elektrischen Ableitungen besteht. Anodisches und kathodisches Kompartiment können durch eine Ionenaustauschermembran voneinander getrennt sein. Auf der Seite der Anode erfolgt ein Übergang von Elektronen aus dem Stoffwechsel der Zellen oder Organismen hin zur Anode. Dieser Übergang erfolgt entweder direkt oder durch Trägersubstanzen, die dem Stoffwechsel entstammen, oder unter Zuhilfenahme hinzugegebener gelöster oder immobilisierter Moleküle, die einen Elektronenfluß aus dem Zell- oder Organismenstoffwechsel hin zur Anode zu katalysieren vermögen (Redoxmediatoren).

Der Stromkreis der Brennstoffzelle wird durch eine geeignete Kathode geschlossen, an der eine elektronenverbrauchende elektrochemische Reaktion abläuft. Als elektrisches Meßsignal, welches direkt von der Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen abhängig ist, kann einerseits der Spannungswert zwischen Anode und Kathode oder andererseits der Stromfluß zwischen Anode und Kathode erfaßt werden.

Zur Erfassung des physiologischen Aktivitätszustandes kann zur Unterscheidung von stoffwechselaktiven, abgestorbenen und stoffwechselinaktiven Zellen oder Organismen eine Kombination aus mindestens zwei identischen Meßzellen gewählt werden, wobei in einer Zelle eine Probe mit einer Probenvorbehandlung (z. B. Substratzugabe oder Produktentfernung), in der zweiten Zelle eine unbehandelte Probe vermessen wird.

In analoger Weise können diese Messungen mit anderen elektrochemischen Methoden, z. B. einem potentiostatisch geregelten Drei-Elektrodensystem, durchgeführt werden. Die mit der Erfindung erzielten Vorteile bestehen insbesondere darin, daß im Gegensatz zu den meisten bekannten Methoden zur Bestimmung der Anzahl von Zellen oder Organismen das Vorhandensein von Partikeln im Nähr- oder Wachstumsmedium sich nicht als störend erweist. Dies beruht darauf, daß die Grundlage der Bestimmung eine spezifische Leistung der Zellen oder Organismen darstellt, die sie von anderen, inaktiven Partikeln unterscheiden.

Im Gegensatz zu Sauerstoffverbrauchsmessungen, die zur Bestimmung der Anzahl und des Aktivitätszustandes von Zellen und Organismen vorgeschlagen wurden, läßt die vorgestellte Erfindung genauere Aussagen zu, da hier lediglich die Aktivitäten des zellulären Energiestoffwechsels erfaßt werden, während der Sauerstoff sowohl ein Substrat für den Energie- als auch für den Baustoffwechsel darstellt. Darüber hinaus kann das vorgestellte Meßsystem auch bei anaeroben Prozessen zur Anwendung gebracht werden.

Schließlich bietet das vorgestellte Verfahren die Möglichkeit zur Beurteilung des aktuellen Aktivitätszustandes der eingesetzten Zellen oder Organismen. Diese Information kann im Vergleich zu anderen Verfahren mit einem recht einfach aufgebauten System erhalten werden, wodurch ein Einsatz z. B. in der Fermentationskontrolle oder bei der Detektion stoffwechselsfördernder

oder stoffwechselschädigender Substanzen auch aus wirtschaftlicher Sicht realisierbar wird.

Das Verfahren gemäß der Erfindung wird durch folgende Beispiele erläutert.

Beispiel 1

Ein belüftetes Glasgefäß, gefüllt mit 200 ml eines Wachstumsmediums (Trypton 10 g, Hefeextrakt 5 g, Natriumchlorid 5 g, Glucose 5 g, alle Angaben für 1 Liter Medium, pH-Wert 7,8), wurde mit Bakterien des Stammes *Escherichia coli* (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Nr. 498) angeimpft. Dem Medium wurde als Redoxmediator 2-Hydroxy-1,4-Naphthochinon in einer Konzentration von 1×10^{-3} mol/l zugegeben. Die Suspension dieser wachsenden Mikroorganismen wurde mittels einer Schlauchpumpe mit einem konstanten Fluß von etwa 20 ml/min durch eine Brennstoffzelle gepumpt. Diese Brennstoffzelle bestand aus einem zylindrischen Plexiglasgehäuse (Außendurchmesser 60 mm, Innendurchmesser 30 mm, Höhe 28 mm). An dessen einer Stirnseite befand sich eine Anode aus Elektrographit (Durchmesser 28 mm, Stärke 1,5 mm, Deutsche Carbone, Frankfurt am Main), an dessen anderer Stirnseite eine Sauerstoff-Gasdiffusionskathode (Durchmesser 38 mm, Stärke 0,3 mm, Typ Silva 8, Varta, Kelkheim). Während sich die Anode vollständig im flüssigkeitsdurchspülten Innenraum der Brennstoffzelle befand, tauchte die Kathode lediglich mit einer Seite in die Flüssigkeit ein, während die andere Seite der Umgebungsluft zugewandt war. Die elektrische Kontaktierung der Anode erfolgte über eine Schraube, die durch die Plexiglaswandung nach außen geführt wurde und zugleich der Befestigung der Anode diente. Die Kontaktierung der Kathode erfolgte über einen Ring aus Edelstahl (Außendurchmesser 38 mm, Innendurchmesser 30 mm, Stärke 0,1 mm). Schraube und Ring wurden mit Kupferdrähten verbunden. Das Volumen der Brennstoffzelle betrug, abzüglich aller An- und Einbauten, etwa 8 ml.

In den äußeren Stromkreis der Brennstoffzelle wurde ein Amperemeter geschaltet, welches das Stromsignal, das allein auf die Stoffwechselaktivitäten der Mikroorganismen zurückzuführen war, anzeigte und dessen zeitlicher Verlauf von einem Schreiber aufgezeichnet wurde. Parallel zu dieser Aufzeichnung wurden im zeitlichen Abstand von etwa 30 min Proben aus dem Glasgefäß entnommen und die Trübung bei 578 nm im Photometer gemessen. Die Trübung des Wachstumsmediums wurde als Maß für die Menge der vorhandenen Mikroorganismen herangezogen.

Ein Vergleich der zeitlichen Änderung des Stromsignals und der Trübung des Mediums zeigte, daß beide Kurven bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase einen nahezu parallelen Verlauf aufwiesen. Stellten die Mikroorganismen ihr Wachstum ein, so blieb der Trübungswert konstant, während der Stromwert abzusinken begann (siehe Abb. 1).

Die Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen konnte im dargestellten Verfahrensbeispiel in form eines elektrischen Signals sichtbar gemacht werden, so daß hiermit nach entsprechender Eichung die Anzahl der Organismen kontinuierlich verfolgt und ihr aktueller Aktivitätszustand jederzeit festgestellt werden konnte.

Beispiel 2

Mit einem Versuchsaufbau, der mit dem in Beispiel 1

beschriebenen mit Ausnahme eines kleineren Glasgefäßes von nur 25 ml Volumen identisch war, wurden nachfolgend beschriebene Untersuchungen durchgeführt. In das System wurde ein Phosphatpuffer, 0,1 mol/l, pH 7,8, eingefüllt. Suspendiert in diesem Puffer waren Bakterien des Stammes *Escherichia coli* in einer Menge, die 1 mg Bakterientrockenmasse in einem Milliliter Suspension entsprach. Dem Puffer wurde weiterhin Glucose bis zu einer Konzentration von 10 mmol/l und als Redoxmediator 2-Hydroxy-1,4-Naphthochinon in einer Konzentration von 1 mmol/l zugegeben. Wenige Minuten nach Befüllen des Systems konnte am Amperemeter ein nahezu konstantes Stromsignal von etwa 0,1 mA abgelesen werden. Dem System wurden nach Erreichen dieses stationären Zustandes unterschiedliche Mengen von Stoffwechselgiften (z. B. m-Kresol) zugegeben, was mit einer Zeitverzögerung von etwa 1 min zu einem kontinuierlichen Absinken des Stromsignals führte. Die Höhe der Stromsignalverminderung stieg dabei mit der zugeführten Schadstoffmenge an. Die minimale Ansprechkonzentration lag für m-Kresol bei 0,2 mg/l (siehe Abb. 2).

Patentansprüche

1. Meßsystem zur Bestimmung der Anzahl und des physiologischen Aktivitätszustandes von Zellen oder Organismen, insbesondere Mikroorganismen, dadurch gekennzeichnet, daß Redoxreaktionen des Energiestoffwechsels der Zellen oder Organismen direkt zur Erzeugung eines elektrischen Meßsignals zugänglich gemacht werden.
2. Meßsystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Erzeugung des Meßsignals in einer elektrochemischen Zelle, vorzugsweise einer bioelektrischen Brennstoffzelle und/oder einem elektrochemischen Sensor mit oder ohne Zugabe eines Redoxmediators erfolgen kann.
3. Meßsystem nach Anspruch 1 und Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Messungen in flüssigen und an festen Substraten durchgeführt werden können.
4. Meßsystem nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Messungen im aeroben oder anaeroben Milieu durchgeführt werden können.
5. Meßsystem nach Anspruch 1 — 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Messungen kontinuierlich oder diskontinuierlich durchgeführt werden können.
6. Meßsystem nach Anspruch 1—5, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Kontrolle und Steuerung biotechnischer Fermentationssysteme eingesetzt werden kann.
7. Meßsystem nach Anspruch 1—5, dadurch gekennzeichnet, daß über die Messung des physiologischen Aktivitätszustandes von Zellen und Organismen verschiedene stoffwechselfördernde bzw. stoffwechselschädigende Substanzen detektiert werden können.
8. Meßsystem nach Anspruch 1—7, dadurch gekennzeichnet, daß hiermit die Reaktionen des Energiestoffwechsels verschiedener Mikroorganismen, höher entwickelter ein- oder mehrzelliger Organismen oder von Zellen komplexer Organismen erfaßt werden können.

- Leerseite -

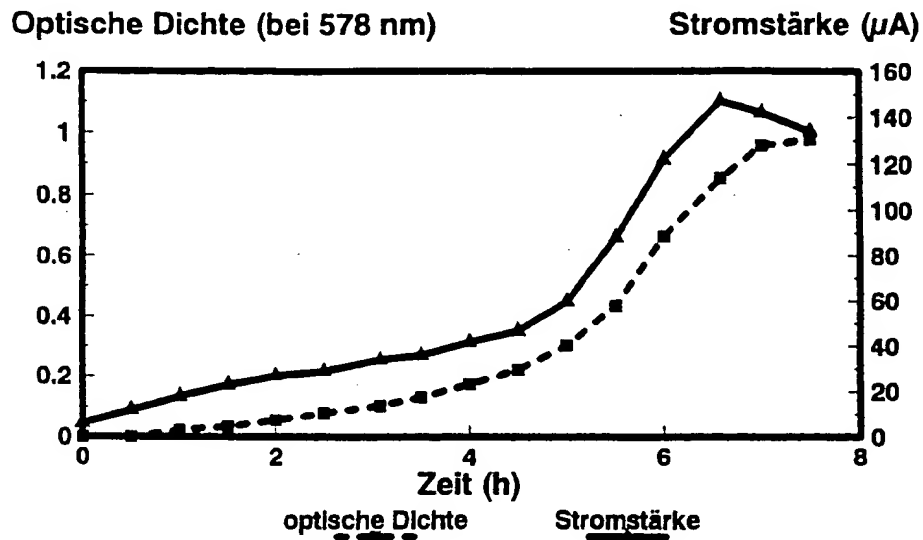


Abbildung 1: Darstellung der Versuchsergebnisse aus Beispiel 1; Beurteilung des Wachstums von *E. coli* durch Trübungsmessung und mit Hilfe des vorgestellten Meßsystems

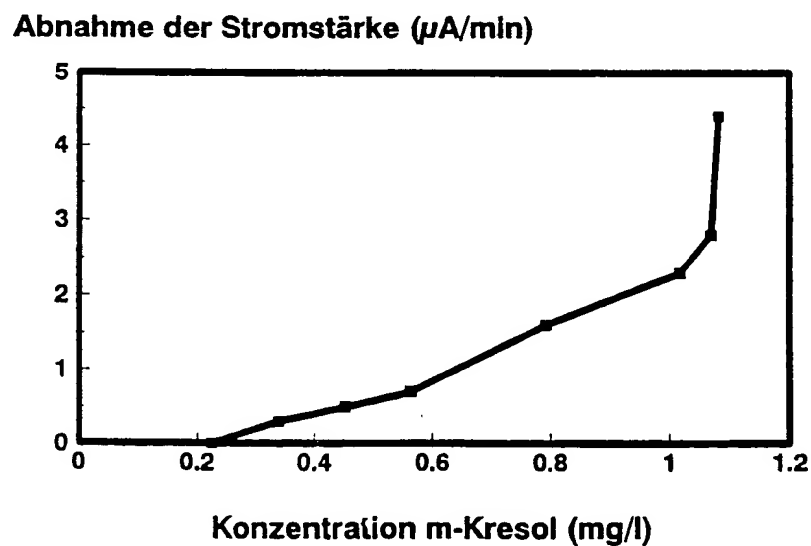


Abbildung 2: Darstellung der Versuchsergebnisse aus Beispiel 2; Abnahme des Stromsignals nach Zugabe eines Schadstoffes am Beispiel von m-Kresol